Lublin, dn. 24-08-2020 r.

Dr hab. Anna Sierosławska, prof. KUL
Katedra Fizjologii Zwierząt i Toksykologii
Wydział Nauk Ścisłych i Nauk o Zdrowiu
Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
w Lublinie

Recenzja pracy doktorskiej lek. wet. Joanny Pajdak-Czaus
pt. Wpływ wirusa zakaźnej martwicy trzustki na zakażenie *Yersinia ruckeri* u pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*)

Recenzowana praca została wykonana w Katedrze Epizootiologii, na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, pod opieką prof. dr hab. Aleksandry Platt-Samoraj, jako promotora pracy oraz dr. n. wet. Elżbiety Terech-Majewskiej, jako promotora pomocniczego. Recenzję wykonano na podstawie uchwały Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 19 czerwca 2020 r.

Współzakażenia organizmów wodnych, w tym ryb, różniącymi się genetycznie patogenami, są zjawiskiem naturalnym i częstym. Znajomość zależności zachodzących przy tego typu zjawiskach jest niezmiernie istotna przy diagnostyce, doborze schematu leczenia i prognozowaniu przebiegu choroby. Mimo to, problematyka wpływu zakażenia jednym organizmem przy współistniejącym innym zakażeniu, jest stosunkowo słabo zbadana i opisana. Wobec powyższego, podjęcie przez Doktorantkę zagadnień stanowiących temat Jej pracy doktorskiej, w aspekcie istotności poznawczej, jak również aplikacyjności, jest w pełni zasadne.

Praca posiada układ typowy dla prac doświadczalnych na stopień naukowy, liczy 103 strony, umieszczono w niej 52 ryciny i 8 tabel. Praca podzielona została na części zatytułowane odpowiednio: Wstęp i przegląd piśmiennictwa, Uzasadnienie i cele pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski. Poszczególne części podzielone są dodatkowo na podrozdziały. Dysertacja zaopatrzona została także w streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz literatury, obejmujący 122 pozycje, informację o źródle finansowania badań oraz umieszczony po spisie treści wykaz skrótów. Praca ma układ przejrzysty, szata edytorska jest staranna, a użyty język jest poprawny stylistycznie.

Wstęp pracy Autorka podzieliła na podrozdziały, wprowadzające w zagadnienia związane z przyjętym przedmiotem badań i tematyką pracy. W części tej Doktorantka wykazała się znajomością aktualnej literatury z zakresu podjętej problematyki. I tak, kolejno, scharakteryzowane zostało znaczenie pstrąga tęczowego jako ryby hodowlanej, wymieniono najważniejsze choroby wirusowe i bakteryjne tego gatunku ryb, ze szczególnym uwzględnieniem zakaźnej martwicy trzustki (IPN) i choroby czerwonej gęby (ERM). Omówiono także stosowane obecnie metody diagnostyczne, używane do identyfikacji tych chorób, z zaznaczeniem różnic w ich czułości i istniejących ograniczeń w stosowaniu w praktyce. Następnie, Autorka przeszła do omówienia znaczenia i podstaw funkcjonowania układu odpornościowego ryb, z uwzględnieniem jego najważniejszych komponentów oraz czynników środowiskowych, mogących modyfikować jego działanie. Wprowadzenie do zagadnień, których dotyczy praca, zostało wykonane dobrze, z właściwym wykorzystaniem aktualnych danych literaturowych z zakresu podjętej tematyki.
W kolejnej części sprecyzowany zostaje cel badań będących przedmiotem pracy. Autorka deklaruje, że głównym celem jest określenie relacji w przypadku zakażenia mieszanego pstrąga tęczowego wirusem IPN (IPNV) oraz wywołującymi ERM bakteriami *Yersinia ruckeri,* poprzez realizację kolejno wskazanych celów, tj. (1) izolację szczepów *Y. ruckeri* oraz IPNV w gospodarstwach rybackich na terenie Polski północno-wschodniej; (2) scharakteryzowanie pozyskanych szczepów *Y. ruckeri*; (3) zakażenie eksperymentalne i ocenę obrazu klinicznego po eksperymentalnym zakażeniu pstrąga tęczowego *Y. ruckeri*, IPNV oraz zakażeniu mieszanym *Y. ruckeri* i IPNV; (4) ocenę wybranych parametrów immunologicznych w przebiegu zakażeń *Y. ruckeri*, IPNV oraz zakażeniu mieszanym *Y. ruckeri* i IPNV; (5) próbę określenia relacji pomiędzy IPNV a *Y. ruckeri* w zakażeniu mieszanym. Problematyka badawcza, w moim odbiorze, została przedstawiona jasno i dotyczy bezsprzecznie aktualnych zagadnień.

Sposób realizacji wymienionych wyżej zadań przedstawiony został w części Materiał i metody. Pierwszy etap pracy stanowiły wyjazdy terenowe i pobór prób do badań bakteriologicznych i wirusologicznych. Wybór miejsc poboru materiału, które stanowiło siedem gospodarstw hodowlanych, został właściwie uzasadniony. Odławiane ryby poddawano badaniu anatomopatologicznemu, a pobierane wycinki tkanek (nerki, skrzela, jelita) poddawano analizie pod kątem obecności badanych patogenów. W przypadku *Y. ruckeri* identyfikację wykonywano trzema metodami, biochemiczną, serologiczną poprzez aglutynację płytkową oraz identyfikację metodą PCR. Do identyfikacji IPNV zastosowano RT-PCR. Drugi etap pracy obejmował zakażenia eksperymentalne narybku pstrąga tęczowego badanymi czynnikami chorobotwórczymi, osobno oraz w połączeniu, w dwóch układach czasowych. W trakcie doświadczeń wykonywano badania kliniczne, anatomopatologiczne oraz immunologiczne. Metodyka pracy została właściwie dobrana w odniesieniu do postawionych zadań badawczych. Opis wykorzystanych metod jest prawidłowy. Z uwagi na dość złożony układ doświadczeń, pomocne było zamieszczenie przez Autorkę ich graficznego schematu. Analogicznie, dobrym pomysłem było umieszczenie schematu pobierania próbek w trakcie zakażenia eksperymentalnego.

Wyniki przeprowadzonych badań zostały przedstawione w formie opisowej, uzupełnionej o prezentację w postaci tabel, wykresów i zdjęć. Zwraca uwagę bogata dokumentacja fotograficzna zmian anatomopatologicznych u badanych ryb (Ryc. 18-34, str. 59-63). Jakkolwiek wynika to z omówienia powyższych fotografii, dla porządku, pod rycinami można dodać informację, że zdjęcia te są dziełem własnym.

Znaczącą część Dyskusji Autorka poświęciła krytycznemu omówieniu metod stosowanych do identyfikacji patogenów. Znajdują się tu odniesienia do danych literaturowych z zakresu diagnostyki chorób, jak i interpretacja uzyskanych przez Doktorantkę wyników. Takie podejście, uwzględniające określone ograniczenia stosowanych metod oraz istniejące trudności w diagnozowaniu chorób w oparciu o te metody, świadczy o dojrzałości badawczej Autorki w interpretacji danych doświadczalnych. W dalszej części Dyskusji przedstawiono opisane do tej pory w literaturze relacje pomiędzy patogenami w trakcie koinfekcji i skutki tychże interakcji, w odniesieniu do badań własnych. Omówiono zaobserwowane efekty wpływu zakażenia w przyjętych układach doświadczalnych na badane wskaźniki odpornościowe ryb. Sposób prowadzenia dyskusji wyników wskazuje na znajomość aktualnego piśmiennictwa dotyczącego problematyki badań.

Pracę zamyka siedem wniosków, które w sposób syntetyczny podsumowują przeprowadzone badania, korespondując z wyznaczonymi celami pracy.

Autorka nie ustrzegła się pewnych nieścisłości, nieprecyzyjnych sformułowań i drobnych błędów, nie mających jednak większego wpływu na wartość merytoryczną pracy. Tak więc, Wstęp rozpoczyna stwierdzenie, iż „ryby (…) stanowią niezastąpione źródło białka (…)". Jakkolwiek nie można kwestionować olbrzymiego znaczenia ryb jako źródła różnorodnych składników odżywczych, tym niemniej wydaje się, że bardziej precyzyjnym określeniem byłoby np. „bogate" lub „cenne" źródło. Do kolejnej nieścisłości należy zaliczenie Turcji, Norwegii i Islandii do krajów Unii Europejskiej (Ryc. 1 i 2, str. 12). W Tabeli 5 (str. 30), określenie „reaktywne związki pośrednie tlenu", powinno być zastąpione przez „reaktywne formy tlenu". Z kolei Tabela 7 (str. 52) w moim odbiorze mogłaby mieć bardziej czytelną legendę, a układ Rycin 10-13 (str. 54) można oznakować i opisać w inny sposób, np. każda para z pokrewnego eksperymentu jako jedna rycina z dodatkowym oznaczeniem np. A i B, zamiast „po lewej" oraz „po prawej". Przy opisie przygotowania zawiesiny leukocytów (str. 49) zręczniej byłoby zamiast ogólnej informacji „1 ml antybiotyku na 100 ml RPMI" podać nazwę użytego antybiotyku (lub ich mieszaniny). Dodatkowo, z uwagi na fakt, że oceniane były funkcje różnych populacji leukocytów, dobrze byłoby także dodać informację, jakie były stosunki liczbowe poszczególnych frakcji komórek w uzyskiwanych izolatach komórkowych.
W tekście pojawiły się także drobne błędy literowe (m.in. str. 22, 45, 51), niedokończone zdanie (str. 32 „Funkcja IL-1β u tych gatunków ryb jest analogiczna do IL-1β ." – zapewne powinno być „do IL-1β ssaków"), czy niepotrzebne kolokwializmy (str. 41, „Obecność „guziczka" na dnie (…).").

Moje wątpliwości budzi sposób porównywania uzyskanych wyników przy analizie parametrów immunologicznych. O ile przyjęty system, tzn. porównanie wartości uzyskanych w obrębie danej grupy w określonym dniu eksperymentu do wartości przed zakażeniem („przed") daje wgląd w dużą dynamikę badanych parametrów w trakcie całego okresu eksperymentalnego, to jednak z punktu widzenia założonego celu pracy, najważniejsze jest porównanie poszczególnych grup w danym dniu eksperymentu do grupy kontrolnej w tym samym dniu. Porównanie takie Autorka zamieszcza na wykresach, nie definiując jednak, co rozumie przez wartości „a, b, c….". Takie przedstawienie danych powoduje pewne trudności w interpretacji, tym bardziej, że Autorka w omówieniu wyników odnosi się do porównania parametrów z wartościami „przed".

Wymienione wyżej uwagi, które nasunęły mi się w trakcie lektury pracy, nie wpływają na pozytywną ocenę całości przedstawionego opracowania. Przygotowana rozprawa doktorska jest pracą oryginalną, podjęte zagadnienia są istotne, aktualne, a przede wszystkim niewystarczająco przebadane. Uzyskane wyniki i poczynione przez Doktorantkę spostrzeżenia

mogą mieć zastosowanie praktyczne przy wyborze schematu leczenia, czy doborze metody diagnostycznej.

Wg mojej oceny, praca doktorska lek. wet. Joanny Pajdak-Czaus spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim, w tym określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z powyższym, przedkładam Radzie Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie lek. wet. Joanny Pajdak-Czaus do dalszych etapów przewodu doktorskiego.